

Tränenersatzlösungen

Neues über Hyaluronsäure

● Die biologische Funktion von Hyaluronsäure (Hyaluronan) in Epithelien hat im Zusammenhang mit der Therapie des Trockenen Auges durch Tränenersatzlösungen bislang kaum Beachtung gefunden. Dabei ist Hyaluronan die wichtigste Komponente der die Zellzwischenräume ausfüllenden extrazellulären Matrix nicht durchbluteter, mehrschichtiger Epithelien. Seine Kettenlänge (Molmasse) ist von entscheidender Bedeutung.

Bereits 1982 beschrieben Polack und McNiece die erfolgreiche Anwendung einer 0,1-Prozent-Lösung von hochmolekularem Hyaluronan bei der Behandlung von schweren Fällen Trockenen Auges¹. Sie hatten die Augentropfen durch Verdünnung von Healon® mit BSS hergestellt. Es dauerte weitere 13 Jahre, bis die ersten Hyaluronan-Augentropfen kommerziell angeboten wurden: Im Jahr 1995 erhielt das vom japanischen Ophthalmika-Hersteller Santen entwickelte Produkt Hyalein® die Zulassung durch die japanische Arzneimittelbehörde. 1998 kamen die ersten Hyaluronan-Augentropfen auf den deutschen Markt. Mittlerweile haben Arzt und Patient die Wahl unter einer Vielzahl an Tränenersatzlösungen mit Hyaluronan, und der Siegeszug dieser Produkte ist ungebrochen.

Hyaluronan als Filmbildner

Die in Tränenersatzlösungen enthaltenen Gleit- und Verdickungsmittel haben unter anderem die Aufgabe, in Augen mit gestörtem Tränenfilm die Gleiteigenschaften des Lids zu verbessern, um Epithelschäden durch mechanischen Stress vorzubeugen. Hyaluronan erfüllt diese Aufgabe nicht nur als natürlicher Bestandteil der Synovialflüssigkeit hervorragend, sondern auch als Bestandteil von Tränenersatzlösungen.

Fließeigenschaften von Tränen und Hyaluronanlösungen: Die Viskosität η ist ein Maß für die Zähflüssigkeit eines Fluids. Die Maßeinheit für die Viskosität lautet mPa·s. Bezugsgröße ist Wasser, das bei 20 °C definitionsgemäß eine Viskosität $\eta = 1$ mPa·s besitzt. Die Viskosität von Wasser verändert sich nicht unter der Einwirkung von Scherkräften. Solche Fluide werden als Newton'sche Flüssigkeiten bezeichnet. Die Fließeigenschaften des Tränenfilms wurden Anfang der 90er-Jahre von Tiffany

eingehend untersucht und beschrieben²⁻⁴. Dank der von den conjunctivalen Becherzellen sezernierten und in der wässrigen Phase des Tränenfilms gelösten Mucine besitzt der Tränenfilm bei geöffnetem Auge in Abwesenheit von Scherkräften eine hohe Viskosität, was entscheidend zu seiner Stabilität beiträgt. Die vom Lid während des Lidschlags erzeugte Scherrate ist definiert als Quotient aus der Geschwindigkeit der Lidbewegung, gemessen in mm/s, dividiert durch den Abstand der Lidkante vom Hornhautepithel, gemessen in mm. Die

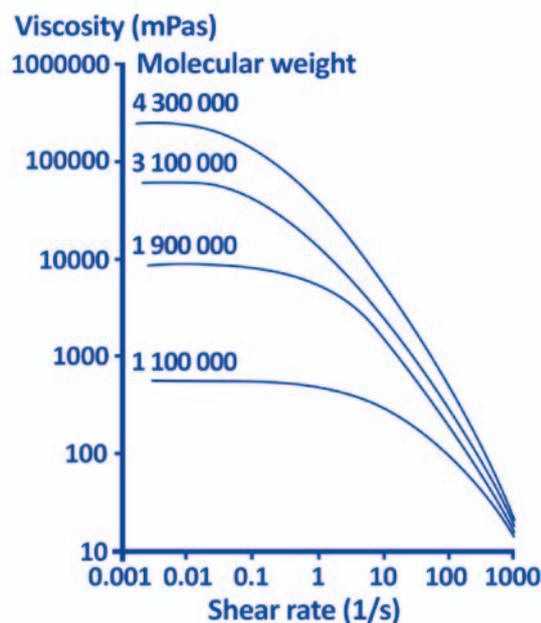


Abb. 1: Abhängigkeit der Viskosität von der Scherrate bei 1 % Hyaluronan-Lösungen mit unterschiedlichen Molmassen (nach Bothner & Wik 1987).

resultierende Masseinheit ist daher s^{-1} . Während des Lidschlags unterliegt der Tränenfilm einer hohen Scherrate von etwa $20.000 s^{-1}$. Unter dem Einfluss dieser Scherrate verringert sich seine Viskosität von etwa 65 auf etwa 10 mPa·s, was einerseits Voraussetzung für die gleichmäßige, schlierenfreie Verteilung der Tränen auf der Cornea ist, andererseits die auf die Epithelien einwirkenden Scherkräfte limitiert [3]. Ein solches Fließverhalten wird als viskoelastisch beziehungsweise scherverdünnend bezeichnet. Eine Störung der Fließeigenschaften des Tränenfilms kann zu rezidivierenden Hornhauterosionen nach Bagatellverlet-

zungen des Hornhautepithels beitragen. Um bestmögliche Wirksamkeit und Verträglichkeit zu erzielen, sollten Tränenersatzlösungen dem viskoelastischen Verhalten der natürlichen Träne möglichst nahe kommen. Hyaluronan bietet dafür ideale Voraussetzungen. Seit den Arbeiten von Bothner & Wik ist bekannt, dass die Viskosität von Hyaluronsäure-Lösungen umso stärker von Scherkräften abhängt, je höher die Molmasse der Hyaluronsäure ist⁵.

Um eine möglichst lange Verweildauer auf dem Auge und damit Wirksamkeit einer Hyaluronsäurelösung bei gleichzeitig bestmöglicher Verteilung und geringen Scherkräften während des Lidschlags zu gewährleisten, ist daher der Einsatz möglichst hoher Molmassen erforderlich. Die Herstellung von Tränenersatzlösungen hat zwei prinzipiell limitierende Faktoren: einmal die Verfügbarkeit von Hyaluronan extrem hoher Molmasse zu wirtschaftlichen Bedingungen und zum Zweiten die Möglichkeit, diese Makromoleküle über Filter mit $0,22 \mu m$ Porengröße steril zu filtrieren. Ein in Wasser gelöstes Hyaluronan-Molekül mit vier Millionen Dalton Molmasse hat im nicht deformierten Zustand einen Durchmesser von etwa $0,5 \mu m$! Erst seit wenigen Jahren gelingt es auch mittels bakterieller Fermentation, Hyaluronan extrem hoher Molmasse herzustellen.

Die Hitzesterilisation von Hyaluronanlösungen im Endbehältnis ist bei Fläschchen und Einmaldosis-Behältnissen aus Kunststoff nicht möglich und würde außerdem zur Verringerung der Kettenlänge des Hyaluronan durch thermische Hydrolyse führen. Einzige Alternative ist daher die Filtration von Lösungen dieses Makromoleküls durch Filter mit $0,22 \mu m$ Porengröße. Je höher die Molmasse von Hyaluronan, umso größer ist die technische Herausforderung und die erforderliche, langjährige Erfahrung im Zusammenhang mit der schonenden Sterilfiltration von Hyaluronanlösungen.

Wasserbindung von Hyaluronan: Das Wasserbindungsvermögen von Hyaluronsäure ist

mit bis zu sechs Liter pro Gramm außergeöhnlich hoch. Hyaluronan mittlerer Molmasse bindet etwa 50 Mal mehr Wasser als Cellulose oder Carboxymethylcellulose (Carmellose), und Hyaluronan sehr hoher Molmasse sogar noch drei Mal mehr als Hyaluronan mittlerer Molmasse⁶. Daher können Tränenersatzlösungen mit Hyaluronan einen wichtigen Beitrag zur Senkung der Verdunstungsrate und dadurch zur Stabilisierung der Osmolarität auch in Augen mit hyperevaporativem Tränenfilm leisten.

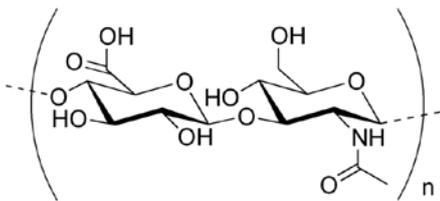


Abb. 2: Baustein der Hyaluronan-Kette.

Chemische Verwandtschaft von Hyaluronan mit Mucinen: Hyaluronan ist ein Glykosaminoglykan (GAG). Glykosaminoglykane, auch als Mucopolysaccharide bezeichnet, sind linear aus sich wiederholenden Disacchariden (= 2 Zuckermoleküle) aufgebaute saure Polysaccharide (= Zuckerketten). Die einzelnen Disaccharideinheiten bestehen aus einer Uronsäure (meist Glucuronsäure, seltener Iduronsäure), die 1-3-glykosidisch mit einem Aminozucker (wie N-Acetylglucosamin) verbunden ist. Die Disaccharid-Einheiten der Ketten sind 1-4-glykosidisch verknüpft.

Mucine (von mucus = Schleim) bestehen aus einem zentralen Proteinmolekül, an dessen Seiten Glykosaminoglykane gebunden sind. Am menschlichen Auge kommen drei Arten von Mucinen vor:

- von den Becherzellen der Conjunctiva in die wässrige Phase des Tränenfilms abgesondertes MUC5AC
- von den Epithelzellen von Conjunctiva und Cornea gebildetes und abgesondertes MUC4
- von den Epithelzellen von Conjunctiva und Cornea gebildetes und membrangebundenes MUC1.

Während MUC1 für die Benetzbarkeit und den Infektionsschutz des Epithels verantwortlich ist, sind MUC5AC und MUC4 für die Fließ-eigenschaften der Tränen verantwortlich und tragen wesentlich zur Wasserbindung bei. Die Glykosaminoglykanmoleküle der Mucine sind wesentlich kleiner als Hyaluronanmoleküle und beinhalten kein Hyaluronan. Jedes Hyaluronanmolekül kann andererseits durch

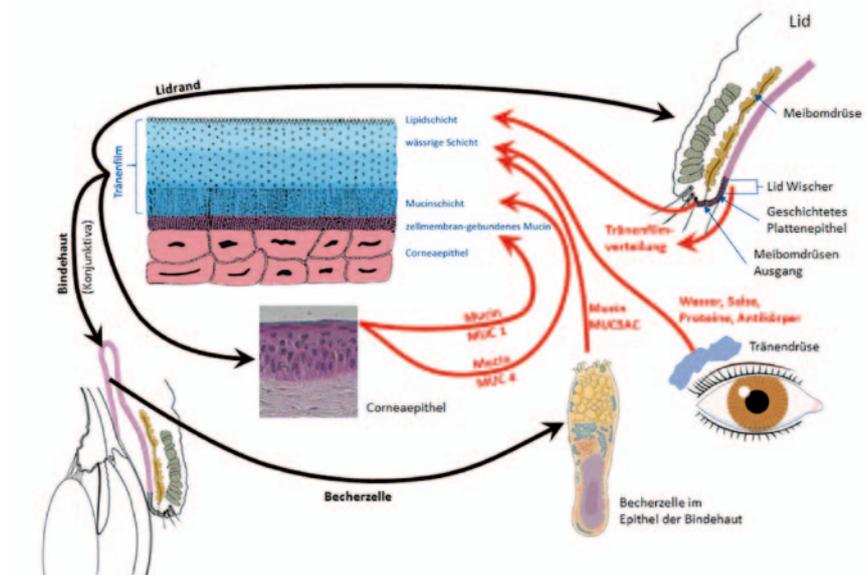


Abb. 3: Regelkreis äußeres Auge.

Adhäsionskräfte mehrere Mucinmoleküle an sich anlagern. Man bezeichnet Hyaluronan daher auch als mucoadhäsiv. Die mucoadhäsive Eigenschaft des Hyaluronan trägt unmittelbar zur Stabilisierung des gestörten Tränenfilms bei.

Synthese, Lokalisierung, Funktion von Hyaluronan

Hyaluronan wird in der Zellmembran synthetisiert und direkt in die die Zellzwischenräume ausfüllende extrazelluläre Matrix extrudiert⁷. Der Körper des Erwachsenen enthält etwa 15 Gramm Hyaluronan, wovon die Hälfte in der Haut lokalisiert ist; bei knapp zehn Kilogramm Haut eines erwachsenen Menschen entspricht dies einem Hyaluronangehalt der Haut von etwa 0,075 Prozent⁸. Hyaluronan ist die wichtigste Komponente der extrazellulären Matrix nicht durchbluteter mehrschichtiger Epithelien. Mit etwa 2,5 mg/ml weisen die sehr engen Zell-Zwischenräume epidermaler Keratinozyten eine sehr hohe Hyaluronan-Konzentration auf⁹. In diesem Gewebe beträgt die Halbwertszeit nur etwa 24 Stunden.

Hyaluronan

- organisiert die extrazelluläre Matrix^{9,10}
- sorgt für Wasserspeicherung und -rückhaltung⁹⁻¹¹
- ist verantwortlich für die Diffusion von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten
- steuert die Keratinozytenproliferation und -differenzierung

- ist ein effizienter Radikalfänger bei UV-Exposition, Infektionen, oxidativem Stress, Gewebnekrose bei Entzündungsprozessen¹²⁻¹³
- ermöglicht die Wanderung von Epithelzellen im Rahmen der Wundheilung¹⁴⁻¹⁵.

Hyaluronan, ein Botenstoff

Die Molmasse des Hyaluronan in der intakten extrazellulären Matrix von Epithelzellen beträgt etwa drei bis vier Millionen Dalton^{9,16}.

Bei vermehrtem Abbau etwa infolge von Verletzungen oder Entzündungsprozessen übt Hyaluronan eine molmassenabhängige Signalfunktion aus:

- Hyaluronan hoher Molmasse wirkt antiangiogenetisch und immunsuppressiv¹⁷⁻²⁰
- Hyaluronan mittlerer Molmasse wirkt entzündungs- und immunstimulierend, sowie angiogenetisch²⁰⁻²²
- Kleine Hyaluronan-Bruchstücke wirken der Apoptose entgegen und induzieren die Synthese von Hitzeschock-Proteinen²³
- Proteolytische Enzyme in Entzündungsprozessen führen zu vermehrtem Hyaluronan-Abbau^{10,21}
- Die Ummantelung von Zellen durch Bindung freien Hyaluronans an Rezeptoren der Zellmembran schützt diese vor Lymphozyten- und Makrophagenangriffen^{10,24}. Diese Ummantelung kann auch durch Zuführen extrinsischen Hyaluronans erzielt werden²⁵.

Intrinsische Epithel-Alterung

Der Hyaluronangehalt der extrazellulären Matrix mehrschichtiger Epithelien ist nur in geringem Maße altersabhängig, jedoch nimmt der Anteil der über Rezeptoren an Zellmembranen gebundene Anteil des Hyaluronan ab dem fünften Lebensjahrzehnt zu und der Anteil des in den Zellzwischenräumen frei verfügbaren, extrahierbaren rapide ab^{20,26,27}. Damit einher geht ein Verlust an Hydratation und Dicke der Epidermis (Pergamenthaut älterer Menschen). An der Wundheilung von Hornhautepithelien ist ausschließlich das nicht an Rezeptoren der Zelloberfläche gebundene Hyaluronan beteiligt²⁸. Dies legt die Vermutung nahe, dass Hyaluronan auch eine wesentliche Rolle beim altersbedingten Trockenen Auge spielt.

Konsequenzen

Am Regelkreis des äußeren Auges sind die verschiedensten Faktoren beteiligt. Die Zusammensetzung der Tränen hängt primär vom Gleichgewicht zwischen der Produktion und Verteilung der verschiedenen Komponenten des Tränenfilms ab. Jede Störung kann zunächst zu einer Erhöhung der Verdunstungsrate und dadurch erhöhten Tränenosmolarität führen. Sekundär leitet eine über längere Zeit andauernde erhöhte Osmolarität einen chronischen Entzündungsprozess ein, in dessen Verlauf alle an der Synthese, Sekretion und Verteilung der Tränenkomponenten beteiligten Organellen in Mitleidenschaft gezogen werden²⁹. Dies hat als Teufelskreis des Trockenen Auges Eingang in die Literatur gefunden³⁰. Traditionelle Tränenersatzmittel hatten primär die Erhaltung der Gleitfähigkeit des Lids zur Vermeidung mechanischer Epithelirritationen zum Ziel. Viskositätserhöhende Zusätze trugen zur Verbesserung der Verweildauer bei. Da die Gleit- und Verdickungsmittel keine oder nur eingeschränkt viskoelastische Eigenschaften besaßen, musste zur Vermeidung von Schliessen auf hohe Viskosität bei geöffnetem Auge tagsüber verzichtet werden. Nachts kamen dann in schweren Fällen Trockenen Auges Gele zur Anwendung, die aber naturgemäß hohe Scherkräfte auf das Epithel ausüben und daher bei rezidivierender Hornhauterosion problematisch sein können.

Die Einführung von Hyaluronan hat diese Situation entscheidend verbessert. Die viskoelastischen Eigenschaften von Hyaluronan-Lösungen erhöhen das Verhältnis zwischen

hoher Viskosität bei geöffnetem Auge und geringer Viskosität beim Lidschlag und dadurch die Verweildauer der Tränenersatzlösung auf dem Auge. Gleichzeitig trägt Hyaluronan über einen längeren Zeitraum zur Wasserbindung bei und dadurch zur Stabilisierung der Tränenosmolarität.

Die biochemische Rolle von Hyaluronan im Epithel wurde bislang in der Augenheilkunde kaum berücksichtigt. Sowohl aus der Sicht der bestmöglichen Verweildauer auf dem Auge und Wasserretention, als auch im Hinblick auf die physiologische und Signal-Funktion des Hyaluronan in der extrazellulären Matrix der Epithelzellzwischenräume sollten vorzugsweise Tränenersatzlösungen mit Hyaluronan sehr hoher Molmasse (mindestens > 2 MDa) zum Einsatz kommen. Das Hyaluronan in Comfort Shield® (Hylan A) hat eine Molmasse > 3 MDa und kann daher das Hyaluronan der Epithelien der Cornea und Conjunctiva substituieren. Aufgrund der geringen Scherkräfte beim Lidschlag wurde Comfort Shield® auch mit gutem Erfolg bei der Therapie rezidivierender Hornhauterosionen eingesetzt (private Mitteilung Mark Tomalla).

Autor: Dr. Wolfgang G.K. Müller-Lierheim
i.com medical GmbH
Kafelerstr. 15, 81241 München
www.icom-medical.de

Literatur

- Polack, F.M. and M.T. McNiece, The treatment of dry eyes with Na hyaluronate (Healon) – a preliminary report. *Cornea*, 1982. 1(2): p. 133-136.
- Tiffany, J.M., The viscosity of human tears. *Int Ophthalmol*, 1991. 15(6): p. 371-376.
- Tiffany, J.M., Viscoelastic properties of human tears and polymer solutions. In: *Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes*, Ed. D.A. Sullivan, Plenum Press, New York 1994: p. 267-270.
- Tiffany, J.M., Composition and biophysical properties of the tear film: knowledge and uncertainty. In: *Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes*, Ed. D.A. Sullivan, Plenum Press, New York 1994: p. 231-238.
- Bothner, H. and O. Wik, Rheology of hyaluronate. *Acta Otolaryngol Suppl*, 1987. 442: p. 25-30.
- Takigami, S., M. Takigami, and G.O. Phillips, Hydration characteristics of the cross-linked hyaluronan derivative hylan. *Carbohydrate Polymers*, 1993. 22: p. 153-160.
- Prehm, P., Hyaluronate is synthesized at plasma membranes. *Biochem J*, 1984. 220(2): p. 597-600.
- Stern, R., Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *Eur J Cell Biol*, 2004. 83(7): p. 317-325.
- Tammi, R. and M. Tammi, Hyaluronan in the Epidermis. *Glycoforum* 1998
- Kogan, G., L. Soltés, R. Stern, and R. Mendichi, Hyaluronic Acid: A Biopolymer with Versatile Physico-Chemical and Biological Properties. In: *Handbook of*

Polymer Research: Monomers, Oligomers, Polymers and Composites. Ed. R.A. Petrick et al., Nova Science Publishers, 2007: p. 393-439

- Lai, J.-Y., D.H.-K. Ma, H.-Y. Cheng, C.-C. Sun, S.-J. Huang, Y.-T. Li, and G.-H. Hsue, Ocular Biocompatibility of Carbodiimide Cross-Linked Hyaluronic Acid Hydrogels for Cell Sheet Delivery Carriers. *J Biomat Sci*, 2010. 21: p. 359-376
- Presti, D. and J.E. Scott, Hyaluronan-mediated Protective Effect Against Cell Damage Caused by Enzymatically Produced Hydroxyl (OH·) Radicals is Dependent on Hyaluronan Molecular Mass. *Cell Biochemistry and Function*, 1994. 12: p. 281-288
- Schiller, J., B. Fuchs, and K. Arnold, The Molecular Organization of Polymers of Cartilage in Health and Disease. *Curr Org Chem*, 2006. 10(14): p. 1771-1789
- Nakamura, M., et al., Hyaluronan facilitates corneal epithelial wound healing in diabetic rats. *Exp Eye Res*, 1997. 64(6): p. 1043-1050.
- Nishida, T., et al., Hyaluronan stimulates corneal epithelial migration. *Exp Eye Res*, 1991. 53(6): p. 753-758.
- Saari, H., Y.T. Kontinen, C. Friman, and T. Sorsa, Differential effects of reactive oxygen species on native synovial fluid and purified human umbilical cord hyaluronate. *Inflammation*, 1993. 17(4): p. 403-415
- Feinberg, R.N. and D.C. Beebe, Hyaluronate in vasculogenesis. *Science*, 1983. 220: p. 1177-1179
- McBride, W.H. and J.B.L. Bard, Hyaluronidase-sensitive halos around adherent cells – Their role in blocking lymphocyte-mediated cytotoxicity. *J Exp Med*, 1979. 149: p. 507-515
- Delmage, J.M., D.R. Powars, P.K. Jaynes, and S.E. Allerton, The selective suppression of immunogenicity by hyaluronic acid. *Ann Clin Lab Sci*, 1986. 16(4): p. 303-310
- Stern, R. and H.J. Maibach, Hyaluronan in skin: aspects of aging and its pharmacologic modulation. *Clin Dermatol*, 2008. 26(2): p. 106-122
- Noble, P.W., Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biology*, 2002. 21: p. 25-29
- West, D.C., I.N. Hampson, F. Arnold, and S. Kumar, Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science*, 1985. 228: p. 1324-1326
- Xu, H., T. Ito, A. Tawada, H. Maeda, H. Yamanokuchi, K. Isahara, K. Yoshida, Y. Uchiyama, and A. Asari, Effect of hyaluronan oligosaccharides on the expression of heat shock protein 72. *J Biol Chem*, 2002. 277(19): p. 17308-17314
- Clarriss, B.J. and J.R. Fraser, Barrier around synovial cells in vitro. *Nature*, 1967. 214, p. 1159
- Knudsen, W. and C.B. Knudsen, Assembly of a chondrocyte-like pericellular matrix on non-chondrogenic cells. Role of the cell surface hyaluronan receptors in the assembly of a pericellular matrix. *J Cell Sci*, 1991. 99(2): p. 227-235
- Meyer, L.J. and R. Stern, Age-dependent changes in hyaluronan in human skin. *J Invest Dermatol*, 1994. 102(3): p. 385-389
- Gherstich, I., T. Lotti, G. Campanile, C. Grappone, and G. Dini, Hyaluronic acid in cutaneous intrinsic aging. *Int J Dermatol*, 1994. 33(2): p. 119-122
- Asari, A. and S. Miyauchi, Medical Applications of Hyaluronan. *Glycoforum* 2000
- Baudouin, C., P. Aragona, E.M. Messmer, A. Tomlinson, M. Calonge, K.G. Boboridis, Y.A. Akova, G. Geerling, M. Labetoulle, and M. Rolando, Role of Hyperosmolarity in the Pathogenesis and Management of Dry Eye Disease: Proceedings of the OCEAN Group Meeting. *The Ocular Surface*, 2013. 11(4): p. 246-258
- Baudouin, C., The Pathology of Dry Eye. *Surv Ophthalmol*, 2001. 45(Suppl 2): p. 211-220